

<b>Applicant</b>	AJINOMOTO CO., INC.			<b>Seal of Examiner</b>	<b>Date of Issue</b>
<b>Agent</b>	China Patent Agent (H.K.) Ltd.				June 13, 2003
<b>Patent Application No.</b>	99802380.9	<b>Application Date</b>	September 22, 1999	<b>Exam Dept.</b>	
<b>Title of Invention</b>	PROCESS FOR CONSTRUCTING AMINO ACID-PRODUCING BACTERIUM AND PROCESS FOR PRODUCING AMINO ACID BY FERMENTATION METHOD WITH THE USE OF THE THUS CONSTRUCTED AMINO ACID PRODUCING BACTERIUM				

### *First Office Action*

(PCT application entering into the national phase)

1. ☒ Under the provision of Art. 35, para. 1 of the Patent Law, the examiner has made an examination as to substance of the captioned patent application for invention upon the request for substantive examination filed by the applicant on\_\_\_\_\_.
- ☐ Under the provision of Art. 35, para. 2 of the Patent Law, the Chinese Patent Office has decided to conduct an examination of the captioned patent application for invention on its own initiative.
2. ☒ The applicant requests that
  - the filing date Sep. 25, 1998 at the JP Patent Office be taken as the priority date of the present application,
  - the filing date Sep. 25, 1998 at the JP Patent Office be taken as the priority date of the present application,
  - the filing date \_\_\_\_\_ at the \_\_\_\_\_ Patent Office be taken as the priority date of the present application.
3. ☐ The following amended documents submitted by the applicant cannot be accepted for failure to conform with Art. 33 of the Patent Law:
  - ☐ the Chinese version of the annex to the international preliminary examination report.
  - ☐ the Chinese version of the amended documents submitted according to the provision of Rule 19 of the Patent Cooperation Treaty.
  - ☐ the amended documents submitted according to the provision of Rule 28 or Rule 41 of the Patent Cooperation Treaty.

☐ the amended documents submitted according to the provision of Rule 51 of the Implementing Regulations of the Patent Law.

See the text portion of this Office Action for detailed reasons why the amendment cannot be accepted.

4. ☐ Examination is conducted on the Chinese version of the initially-submitted international application.

☒ Examination is conducted on the following document(s):

☒ pages 1-24, 26-46, 54-60, 62-72 of the description, based on the Chinese version of the initially-submitted international application documents;

page \_\_\_\_\_ of the description, based on the Chinese version of the annex to the international preliminary examination report;

page \_\_\_\_\_ of the description, based on the amended documents submitted according to the provision of Rule 28 or Rule 41 of the Patent Cooperation Treaty;

pages 25, 47-53, 61, 73-80 of the description, based on the amended documents submitted according to the provision of Rule 44 of the Implementing Regulations of the Patent Law.

☒ claim(s) 1-17, based on the Chinese version of the initially-submitted international application documents;

claim(s) \_\_\_\_\_, based on the Chinese version of the amended documents submitted according to the provision of Rule 19 of the Patent Cooperation Treaty;

claim(s) \_\_\_\_\_, based on the Chinese version of the annex to the international preliminary examination report;

claim(s) \_\_\_\_\_, based on the amended documents submitted according to the provision of Rule 28 or Rule 41 of the Patent Cooperation Treaty;

claim(s) \_\_\_\_\_, based on the amended documents submitted according to the provision of Rule 51 of the Implementing Regulations of the Patent Law.

☒ Fig(s) pages 1-3, based on the Chinese version of the initially-submitted international application documents;

Fig(s) \_\_\_\_\_, based on the Chinese version of the annex to the international preliminary examination report;

Fig(s) \_\_\_\_\_, based on the amended documents submitted according to the provision of Rule 28 or Rule 41 of the Patent Cooperation Treaty;

Fig(s) \_\_\_\_\_, based on the amended documents submitted according to the provision of Rule 51 of the Implementing Regulations of the Patent Law.

5. ☒ The following reference document(s) is/are cited in this Office Action (its/their serial

number(s) will continue to be used in the subsequent course of examination):

Serial No.	Number or Title(s) of Document(s)	Date of Publication (or filing date of interfering application)
1	CN 1155300 A	Date Jul. 23, 1997
2	WO 9303158A1	Date Feb. 18, 1993
3		Date
4		

6. Concluding comments on the examination:

☒ On the description:

- ☐ What is stated in the application comes within the scope of that no patent right shall be granted as prescribed in Art. 5 of the Patent Law.
- ☐ The description is not in conformity with the provision of Art. 26, para. 3 of the Patent Law.
- ☒ The drafting of the description is not in conformity with the provision of Rule 18 of the Implementing Regulations.

☒ On the claims:

- ☐ Claim(s) \_\_\_\_\_ come(s) within the scope of that no patent right shall be granted as prescribed in Art. 25 of the Patent Law.
- ☒ Claim(s) 1-2 has/have no novelty as prescribed in Art. 22, para. 2 of the Patent Law.
- ☒ Claim(s) 17 has/have no inventiveness as prescribed in Art. 22, para. 3 of the Patent Law.
- ☐ Claim(s) \_\_\_\_\_ has/have no practical applicability as prescribed in Art. 22, para. 4 of the Patent Law.
- ☒ Claim(s) 1-4, 6, 10, 16 is/are not in conformity with the provision of Art. 26, para. 4 of the Patent Law.
- ☒ Claim(s) 1, 16, 17 is/are not in conformity with the provision of Art. 31, para. 1 of the Patent Law.
- ☒ Claim(s) 12-15 is/are not in conformity with the provisions of Rule 20 of the Implementing Regulations.
- ☐ Claim(s) \_\_\_\_\_ is/are not in conformity with the provision of Art. 9 of the Patent Law.
- ☐ Claim(s) \_\_\_\_\_ is/are not in conformity with the provision of Rule 12, para. 1 of the Implementing Regulations.

See the text portion of this Office Action for detailed analysis of the above concluding comments.

7. Based on the above concluding comments, the examiner deems that
- ☐ the applicant should make amendment to the application document(s) according to the requirements put forward in the text portion of this Office Action.
  - ☒ the applicant should expound in his/its observations why the captioned patent application is patentable and make amendment to what is not in conformity with the provisions pointed out in the text portion of this Office Action, otherwise, no patent right shall be granted.
  - ☐ the patent application contains no substantive content(s) for which a patent right may be granted, if the applicant has no sufficient reason(s) to state or his/its stated reason(s) is/are not sufficient, said application will be rejected.
  - ☐

8. The applicant should note the following items:

- (1) Under Art. 37 of the Patent Law, the applicant should submit his/its observations within **four** months from the date of receipt of this Office Action; if, without any justified reason(s), the time limit for making written response is not met, said application shall be deemed to have been withdrawn.
- (2) The amendment made by the applicant to said application should be in conformity with the provision of Art. 33 of the Patent Law, the amended text should be in duplicate and its form should conform with the related provisions of the Guide to Examination.
- (3) If no arrangement is made in advance, the applicant and/or the agent shall not come to the Chinese Patent Office to have an interview with the examiner.
- (4) The observations and/or amended text should be sent to the Receiving Section of the Chinese Patent Office by mail or by personal delivery, if not sent to the Receiving Section by mail or by personal delivery, the document(s) will have no legal effect.**

9. This Office Action consists of the text portion totalling 4 page(s) and of the following attachment(s):

- ☒ 2 copy(copies) of the reference document(s) totalling 66 page(s).

Examination Dept. No. \_\_\_\_\_

Examiner \_\_\_\_\_



# 中华人民共和国国家知识产权局

邮政编码: 100032

北京市西城区金融街 27 号投资广场 B 座 19 层

中国专利代理(香港)有限公司

卢新华 谭明胜

申请号: 99802380.9

发文日期:



申请人: 味之素株式会社

0061025P

发明名称: 构建产生氨基酸的细菌的方法, 及通过发酵该经构建的产生氨基酸的细菌以制备氨基酸的方法

## 第一次审查意见通知书

(进入国家阶段的 PCT 申请)

1. ☒ 应申请人提出的实审请求, 根据专利法第 35 条第 1 款的规定, 国家知识产权局对上述发明专利申请进行实质审查。

☐ 根据专利法第 35 条第 2 款的规定, 国家知识产权局专利局决定自行对上述发明专利申请进行审查。

2. ☒ 申请人要求以其在:

日本 专利局的申请日 1998 年 9 月 25 日为优先权日,

日本 专利局的申请日 1998 年 9 月 25 日为优先权日,

专利局的申请日 年 月 日为优先权日。

3. ☐ 申请人于 年 月 日提交的修改文件, 不符合专利法实施细则第 51 条的规定。

☐ 申请人提交的下列修改文件不符合专利法第 33 条的规定。

☐ 国际初步审查报告附件的中文译文。

☐ 依据专利合作条约第 19 条规定所提交的修改文件的中文译文。

☐ 依据专利合作条约第 28 条或 41 条规定所提交的修改文件。

4. ☐ 审查是针对原始提交的国际申请的中文译文进行的。

☒ 审查是针对下述申请文件进行的:

☒ 说明书 第 1-24, 26-46, 54-60, 62-72 页, 按照原始提交的国际申请文件的中文译文;

第 页, 按照国际初步审查报告附件的中文译文;

第 页, 按照依据专利合作条约第 28 条或 41 条规定所提交的修改文件;

第 页, 按照依据专利法实施细则第 51 条规定所提交的修改文件。

☒ 第 25, 47-53, 61, 73-80 页, 按照依据专利法实施细则第 44 条规定所提交的修改文件。

☒ 权利要求 第 1-17 项, 按照原始提交的国际申请文件的中文译文;

第 项, 按照依据专利合作条约第 19 条规定所提交的修改文件的中文

译文。

第 项, 按照国际初步审查报告附件的中文译文;

第 项, 按照依据专利合作条约第 28 条或 41 条所提交的修改文件;

第 项, 按照依据专利法实施细则第 51 条规定所提交的修改文件。

☐ 附图

第 1-3 页, 按照原始提出的国际申请文件的中文译文;

第 页, 按照国际初步审查报告附件的中文译文;

第 页, 按照依据专利合作条约第 28 条或 41 条所提交的修改文件;

第 页, 按照依据专利法实施细则第 51 条规定所提交的修改文件。

☒ 本通知书引用下述对比文献(其编号在今后的审查过程中继续沿用):

28 OCT 2003





# 中华人民共和国国家知识产权局

编号	文件号或名称	公开日期 (或抵触申请的申请日)
1	CN 1155300 A	1997 年 7 月 23 日
2	WO 9303158 A1	1993 年 2 月 18 日
3		年 月 日
4		年 月 日

## 6. 审查的结论性意见:

### ☒ 关于说明书:

☐ 申请的内容属于专利法第 5 条规定的不予授予专利权的范围。

☐ 说明书不符合专利法第 26 条第 3 款的规定。

☐ 说明书不符合专利法第 33 条的规定。

☒ 说明书的撰写不符合专利法实施细则第 18 条的规定。

### ☒ 关于权利要求书:

☒ 权利要求 1-2

不具备专利法第 22 条第 2 款规定的新颖性。

☒ 权利要求 17

不具备专利法第 22 条第 3 款规定的创造性。

☐ 权利要求

不具备专利法第 22 条第 4 款规定的实用性。

☐ 权利要求

属于专利法第 25 条规定的不予授予专利权的范围。

☒ 权利要求 1-4, 6, 10, 16

不符合专利法第 26 条第 4 款的规定。

☒ 权利要求 1, 16, 17

不符合专利法第 31 条第 1 款的规定。

☐ 权利要求

不符合专利法第 33 条的规定。

☐ 权利要求

不符合专利法实施细则第 13 条第 1 款的规定。

☐ 权利要求

不符合专利法实施细则第 2 条第 1 款的规定。

☒ 权利要求 12-15

不符合专利法实施细则第 20 条的规定。

☐ 权利要求

不符合专利法实施细则第 21 条的规定。

☐ 权利要求

不符合专利法实施细则第 22 条的规定。

☐ 权利要求

不符合专利法实施细则第 23 条的规定。

上述结论性意见的具体分析见本通知书的正文部分。

## 7. 基于上述结论性意见, 审查员认为:

☐ 申请人应按照通知书正文部分提出的要求, 对申请文件进行修改。

☒ 申请人应在意见陈述书中论述其专利申请可以被授予专利权的理由, 并对通知书正文部分中指出的不符合规定之处进行修改, 否则将不能授予专利权。

☐ 专利申请中没有可以被授予专利权的实质性内容, 如果申请人没有陈述理由或者陈述理由不充分, 其申请将被驳回。

## 8. 申请人应注意下述事项:

(1) 根据专利法第 37 条的规定, 申请人应在收到本通知书之日起的肆个月内陈述意见, 如果申请人无正当理由逾期不答复, 其申请将被视为撤回。

(2) 申请人对其申请的修改应符合专利法第 33 条的规定, 修改文本应一式两份, 其格式应符合审查指南的有关规定。

(3) 申请人的意见陈述书和 / 或修改文本应邮寄或递交国家知识产权局专利局受理处, 凡未邮寄或递交给受理处的文件不具备法律效力。

(4) 未经预约, 申请人和 / 或代理人不得前来国家知识产权局专利局与审查员举行会晤。

## 9. 本通知书正文部分共有 3 页, 并附有下列附件:

☒ 引用的对比文件的复印件共 2 份 66 页。

审查员



2003 年 5 月 24 日



## 第一次审查意见通知书正文

本发明专利申请涉及构建一种具有高产量的产生氨基酸能力的细菌突变株的方法, 以及经发酵作用由此突变株产生 L-氨基酸的方法。经审查具体意见如下:

### 1. 独立权利要求 1 与独立权利要求 16、17 不具备单一性

权利要求 1 请求保护一种棒状菌的制备方法, 包括在棒状菌染色体上的氨基酸或核酸生物合成基因的启动子序列中发生突变, 获得突变株并进行筛选; 权利要求 16 和 17 请求保护经由发酵作用产生氨基酸或核酸的方法, 包括菌株的培养、产物的累积和收集, 由此可见, 权利要求 1 请求保护的菌株制备方法和权利要求 16、17 请求保护的发酵方法没有相同或相应的特定技术特征, 不属于一个总的发明构思, 因此不符合专利法第三十一条第一款的规定。

### 2. 权利要求 1 和 2 不具备新颖性

权利要求 1 请求保护氨基酸或核酸生产力增强的棒状菌的制备方法, 对比文件 1 (CN 1155300A) 公开了一种谷氨酸生产能力增强的棒状杆菌的制备方法, 它是在与谷氨酸生物合成有关的  $\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶基因的启动子序列中发生突变, 从而筛选得到突变株 (见说明书第 1 页第 30 行至第 2 页第 31 行, 第 7 页第 2 行至第 8 行, 第 25 页第 4 行至第 8 行)。由此可见, 对比文件 1 公开的内容与权利要求 1 在技术领域、解决的技术问题、技术方案和效果上都相同, 只是对比文件 1 用更下位的概念来限定同类性质的技术特征, 因此权利要求 1 请求保护的技术方案相对于对比文件 1 不具有新颖性, 不符合专利法第二十二条第二款的规定。

权利要求 2 对权利要求 1 作进一步限定, 对比文件 1 公开的是谷氨酸生产能力增强的棒状杆菌的制备方法 (见说明书第 1 页第 30 行至第 2 页第 31 行, 第 7 页第 2 行至第 8 行, 第 25 页第 4 行至第 8 行), 因此当权利要求 2 的氨基酸选自谷氨酸时, 权利要求 2 请求保护的技术方案相对于

对比文件 1 也不具有新颖性，不符合专利法第二十二条第二款的规定。

### 3. 权利要求 17 不具备创造性

权利要求 17 请求保护一种经由发酵作用产生 L-谷氨酸的方法，对比文件 2 (WO9303158) 公开了具有抗 4-氟谷氨酸的棒状杆菌突变株，其谷氨酸脱氢酶的活性提高，从而增加了谷氨酸的产量（见说明书第 33 页第 25 行至第 34 页第 9 行），由此可见，对比文件 2 给出了用对 4-氟谷氨酸具有抗性的棒状菌来发酵生产 L-谷氨酸的技术启示，而菌种的培养和产物的收集都属于本领域技术人员的公知常识，因此权利要求 17 请求保护的技术方案相对于对比文件 2 不具有突出的实质性特点和显著的进步，不符合专利法第二十二条第三款有关创造性的规定。

### 4. 权利要求 1-4、6、10 和 16 没有以说明书为依据

本申请的说明书记载了对谷氨酸脱氢酶 (GDH)、柠檬酸合成酶 (CS)、异柠檬酸合成酶 (ICDH)、丙酮酸脱氢酶 (PDH) 和精氨酸琥珀酸合成酶 (argG) 基因的启动子序列进行突变从而得到谷氨酸和精氨酸生产能力增强的棒状菌的制备方法，但由于不同的酶基因有不同的启动子序列和位置，说明书也没有提供必要的证据来证明上述突变对其他的酶基因有效，也就是说，本领域技术人员按照说明书的记载内容不能推断出通过突变基因启动子序列的方法一定能获得氨基酸（除谷氨酸和精氨酸）和核酸生产能力增强的棒状菌，所以权利要求 1、2、3 和 16 没有以说明书为依据，不符合专利法第二十六条第四款的规定。

权利要求 4 对 GDH 基因的启动子作限定，包括-10 区域 TATAAT 序列中的 ATAAT 被其他碱基取代的序列，根据说明书（第 6 页第 27 行至 29 行）阐述的理由：只以“T”置换野生型-10 区域序列的 CATAAT 的第 1 个“C”就明显增加 GDH 的比活性，但不能就此断定置换其他碱基也一定能增加 GDH 的比活性，虽然权利要求限定了是不会抑制启动子的序列，但说明书没有明确记载具体是怎样的序列。同理，权利要求 10 也存在这一缺陷，因此权利要求 4 和 10 也没有以说明书为依据，不符合专利法第二十六条第四款的规定。



权利要求6对CS基因的启动子作限定,其中-35区域是TTGTCA序列,但是根据说明书(第7页第9行,表7)的记载,-35区域是TTGACA序列时CS的活性有所增强。因此权利要求6也没有以说明书为依据,不符合专利法第二十六条第四款的规定。

5. 独立权利要求12-15表述不清楚

权利要求12请求保护一种谷氨酸合成基因,具有权利要求4-8所叙述的启动子,首先,谷氨酸合成基因有多种,每一种酶基因都有相应的启动子序列,不能混为一谈,所以该权利要求的内容表述不清楚;其次,权利要求4和5在保护范围上有部分重叠,它们属于不同层次保护范围的权利要求,由于权利要求12同时引用了权利要求4和5,导致一条权利要求中出现不同层次的保护范围,而独立权利要求的保护范围应当是清楚、唯一的。同理,权利要求13-15也存在上述缺陷。所以权利要求12-15没有清楚的表述请求保护的范,不符合专利法实施细则第二十条第一款的规定。

6. 说明书第32页第6行的碱基位置应为2257而不是“22257”,不符合专利法实施细则第十八条第三款的规定。

基于上述理由,本申请按照目前的文本不能授予专利权,如果申请人不能在本通知书指定的答复期限内按照上述审查意见对申请文件进行修改并陈述理由,其申请将被驳回。

[19]中华人民共和国专利局

[51]Int.Cl<sup>6</sup>



# [12] 发明专利申请公开说明书

C12P 13/08  
C12P 13/14 C12N 1/21  
C12N 15/53

[21] 申请号 95194559.9

[43]公开日 1997 年 7 月 23 日

[11] 公开号 CN 1155300A

[22]申请日 95.6.7

[30]优先权

[32]94.6.14 [33]JP[31]131744/94

[86]国际申请 PCT/JP95/01131 95.6.7

[87]国际公布 WO95/34672 日 95.12.21

[85]进入国家阶段日期 97.2.5

[71]申请人 味之素株式会社

地址 日本东京都

[72]发明人 朝仓阳子 白田佳弘 辻本信晴  
木村英一郎 阿部知津 河原义雄  
中松亘 仓桥修

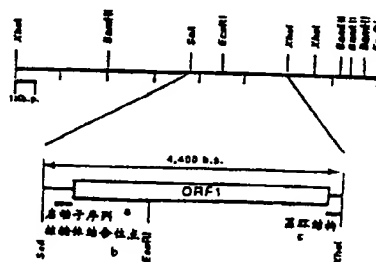
[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司  
代理人 吴玉和 姜建成

权利要求书 1 页 说明书 46 页 附图页数 1 页

[54]发明名称  $\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶基因

[57]摘要

公开内容为  $\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶缺陷的产 L-谷氨酸棒状杆菌, 一种用该细菌生产 L-谷氨酸的方法, 编码来源于产 L-谷氨酸棒状杆菌具有  $\alpha$ -KGDH 活性的酶的基因, 含有该基因的重组 DNA, 携带该重组 DNA 的棒状杆菌, 以及一种用携带该重组 DNA 并具有 L-赖氨酸生产能力的细菌生产 L-赖氨酸的方法。



a: 起始子序列  
b: 编码序列起始点  
c: 编码序列终止点

## 权 利 要 求 书

1. 一种产 L - 谷氨酸棒状杆菌, 它由于染色体上编码具有  $\alpha$  - 酮戊二酸脱氢酶活性的酶或其启动子的核苷酸序列中一个或几个核苷酸的替换、缺失、插入、加入或倒位而造成  $\alpha$  - 酮戊二酸脱氢酶活性缺失。
- 5 2. 一种生产 L - 谷氨酸的方法, 其包括: 在液体培养基中培养权利要求 1 的产 L - 谷氨酸棒状杆菌, 在培养液中生产并积累 L - 谷氨酸, 然后收集。
3. 一种编码来源于产 L - 谷氨酸棒状杆菌并具有  $\alpha$  - 酮戊二酸脱氢酶活性的酶的基因。
- 10 4. 权利要求 3 的基因, 其中具有  $\alpha$  - 酮戊二酸脱氢酶活性的酶的氨基酸序列含有序列表中 SEQ ID NO.1 给出的氨基酸序列或是含有对该氨基酸序列的  $\alpha$  - 酮戊二酸脱氢酶活性无影响的一个或几个氨基酸残基的替换、缺失或插入的氨基酸序列。
- 15 5. 一种重组 DNA, 它是通过将编码来源于产 L - 谷氨酸棒状杆菌的具有  $\alpha$  - 酮戊二酸脱氢酶活性的酶的基因与在棒状杆菌中起作用的载体相连接得到的。
6. 携带权利要求 5 的重组 DNA 的棒状杆菌。
7. 一种生产 L - 赖氨酸的方法, 其包括: 在液体培养基中培养携带权利要求 5 的重组 DNA 并具有 L - 赖氨酸生产能力的棒状杆菌, 在培养液中生产并积累 L - 赖氨酸, 然后收集。
- 20

# 说明书

## $\alpha$ - 酮戊二酸脱氢酶基因

### 技术领域

- 5 本发明涉及用于 L - 谷氨酸和 L - 赖氨酸发酵生产的棒状杆菌的培育和利用。特别地, 本发明涉及 $\alpha$  - 酮戊二酸脱氢酶 ( $\alpha$  - KGDH) 有缺陷的棒状产 L - 谷氨酸细菌, 一种利用该细菌生产 L - 谷氨酸的方法, 一种编码具有 $\alpha$  - KGDH 活性的酶并来源于棒状产 $\alpha$  - 谷氨酸细菌的基因 ( $\alpha$  - KGDH 基因), 含有该基因的重组 DNA, 携带该重组 DNA
- 10 的棒状杆菌以及一种利用携带该重组 DNA 并具有 L - 赖氨酸生产能力的棒状杆菌生产 L - 赖氨酸的方法。

### 背景技术

迄今为止在工业上利用短杆菌或棒状杆菌属的棒状杆菌采用发酵方法生产 L - 谷氨酸。

- 15 最近公开一种大肠杆菌突变株, 其中  $\alpha$  - KGDH 活性缺陷或降低并且谷氨酸分解活性降低, 具有高的 L - 谷氨酸生产能力 (日本公开专利: 5 - 244970 号)。

- 相反地, 据报道一种短杆菌属的细菌突变株与其母本菌株相比,  $\alpha$  - KGDH 活性降低, L - 谷氨酸生产能力却近似相等 (农业生物化学, 20 44, 1897 (1980), 农业生物化学, 46, 493 (1982))。因此认为 $\alpha$  - KGDH 活性水平对棒状杆菌中 L - 谷氨酸的生产并不重要。

- 另一方面, 发现一种短杆菌属的产 L - 谷氨酸细菌的突变株, 其 $\alpha$  - KGDH 活性降低, 将该细菌培养于以过量生物素为碳源且不加入如青霉素及表面活性剂的有抑制生物素效应的物质的培养基中, 细菌高效地
- 25 生产 L - 谷氨酸 (最大产率 53 %) (日本公开专利 6 - 23779 号)。然而, 如上述已认为 $\alpha$  - KGDH 活性水平对棒状杆菌中 L - 谷氨酸的生产并不重要, 却没有已将产 L - 谷氨酸棒状杆菌的 $\alpha$  - KGDH 基因克隆并分析的例子。并且并未发现 $\alpha$  - KGDH 完全缺陷的棒状杆菌突变株。

### 发明内容

- 30 本发明的一个目的是得到来源于产 L - 谷氨酸棒状杆菌的 $\alpha$  - KGDH 基因, 制备含有该基因的重组 DNA, 利用该重组 DNA 转化的微生物搞清 $\alpha$  - KGDH 活性对 L - 谷氨酸发酵生产的影响, 并因而提供一

种培育产 L - 谷氨酸棒状杆菌的新方法。具体地，本发明的一个目的是通过破坏染色体 DNA 上  $\alpha$  - KGDH 基因得到  $\alpha$  - KGDH 活性缺陷的产 L - 谷氨酸棒状杆菌，并提供一种用该细菌生产 L - 谷氨酸的方法。而且，本发明试图提供一种携带含有  $\alpha$  - KGDH 基因的重组 DNA 的棒状杆菌，和一种利用携带该重组 DNA 并具有 L - 赖氨酸生产能力的棒状杆菌生产 L - 赖氨酸的方法。

本发明人得到一种来源于产 L - 谷氨酸棒状杆菌的  $\alpha$  - KGDH 基因，阐明其结构，用已引入该基因的质粒转化一种产 L - 谷氨酸棒状杆菌，并研究得到的转化体的  $\alpha$  - KGDH 活性水平与 L - 谷氨酸生产能力。结果发现  $\alpha$  - KGDH 活性显著影响 L - 谷氨酸的生产。而且，本发明人发现一种菌株，其中通过破坏产 L - 谷氨酸棒状杆菌染色体上  $\alpha$  - KGDH 基因消除了  $\alpha$  - KGDH 活性，该菌株培养于含有过量生物素且不加入如表面活性剂和青霉素的任何抑制生物素作用的物质的培养基中，生产并积累相当量的 L - 谷氨酸。另外，本发明人将含有  $\alpha$  - KGDH 基因的重组 DNA 导入具有 L - 赖氨酸生产能力的棒状杆菌。结果发现，得到转化体的 L - 赖氨酸生产能力显著提高，于是本发明在这些发现的基础上完成。

换句话说，本发明提供：

(1) 一种产 L - 谷氨酸棒状杆菌，它由于染色体上编码具有  $\alpha$  - KGDH 活性的酶的基因及其启动子的核苷酸序列中一个或几个核苷酸的替换、缺失、插入、加入或倒位而造成  $\alpha$  - KGDH 活性缺失。

(2) 一种生产 L - 谷氨酸的方法，包括：在液体培养液中培养上述 (1) 款的产 L - 谷氨酸棒状杆菌，在培养液中生产并积累 L - 谷氨酸，再收集。

(3) 一种来源于产 L - 谷氨酸棒状杆菌的  $\alpha$  - KGDH 基因。

(4) 通过将来源于产 L - 谷氨酸棒状杆菌的  $\alpha$  - KGDH 基因与在棒状杆菌中起作用的载体相连接得到的重组 DNA。

(5) 携带上述 (4) 款的重组 DNA 的棒状杆菌。

(6) 一种生产 L - 赖氨酸的方法，包括：在液体培养基中培养携带上述 (4) 款的重组 DNA 并具有 L - 赖氨酸生产能力的棒状杆菌，在培养液中生产并积累 L - 赖氨酸，再收集。

本发明进一步如下详述，

本发明的产 L - 谷氨酸棒状杆菌包括以前归类于短杆菌属但现在属于棒状杆菌属的细菌( 国际系统微生物学杂志, 41, 255, ( 1981 ) ), 还包括属于短杆菌属但与棒状杆菌属亲缘关系近的细菌。这样的产 L - 谷氨酸棒状细菌举例如下:

- 5      嗜乙酸棒状杆菌
- 乙酰谷氨酸棒状杆菌
- 颈棒状杆菌
- 谷氨酸棒状杆菌
- 百合棒状杆菌 ( 谷氨酸棒状杆菌 )
- 10     melassecola 棒状杆菌
- 扩展短杆菌 ( 谷氨酸棒状杆菌 )
- 黄色短杆菌 ( 谷氨酸棒状杆菌 )
- immariophilum 短杆菌
- 乳发酵短杆菌 ( 谷氨酸棒状杆菌 )
- 15     玫瑰色短杆菌
- 糖分解短杆菌
- 生硫短杆菌
- 嗜热产氨 ( thermoaminogenes ) 棒状杆菌
- 特别地, 举下列菌株为例:
- 20     嗜乙酸棒状杆菌 ATCC 13870
- 乙酰谷氨酸棒状杆菌 ATCC 15806
- 颈棒状杆菌 ATCC 15991
- 谷氨酸棒状杆菌 ATCC 13020
- 百合棒状杆菌 ( 谷氨酸棒状杆菌 ) ATCC 15990
- 25     melassecola 棒状杆菌 ATCC 17965
- 扩展短杆菌 ( 谷氨酸棒状杆菌 ) ATCC 14020
- 黄色短杆菌 ( 谷氨酸棒状杆菌 ) ATCC 14067
- immariophilum 短杆菌 ATCC14068
- 乳发酵短杆菌 ( 谷氨酸棒状杆菌 ) ATCC 13869
- 30     玫瑰色短杆菌 ATCC 13825
- 糖分解短杆菌 ATCC 14066
- 生硫短杆菌 ATCC 19240

嗜热产氨棒状杆菌 AJ 12340 (FERM BP1539)

本发明的 $\alpha$ -KGDH 基因可以如下述那样从上述产 L-谷氨酸棒状杆菌野生菌株或其突变株的染色体 DNA 中获得。

已知大肠杆菌的 $\alpha$ -KGDH 复合体由三个亚基  $E_1$  ( $\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶: EC 1.2.4.2),  $E_2$  (二氢硫辛胺琥珀酰氨转移酶: EC 2.3.1.61), 和  $E_3$  (硫辛胺脱氢酶: 1.6.4.3) 组成,  $E_1$  和  $E_2$  基因形成操纵子结构,  $E_3$  与丙酮酸脱氢酶 (EC 1.2.4.1) 共用。大肠杆菌  $E_1$  与  $E_2$  基因的核苷酸序列已搞清 (欧洲生物化学杂志, 141, 351 (1984), 细菌学杂志, 141, 361 (1984))。

10 对枯草芽孢杆菌,  $E_1$  和  $E_2$  基因的核苷酸序列也已搞清 (细菌学杂志, 171, 3667 (1989), 基因, 61, 217 (1987), 等)。

于是通过利用大肠杆菌和枯草芽孢杆菌  $E_1$  基因核苷酸序列的同源性, 本发明人成功地分离并克隆了来源于产 L-谷氨酸棒状杆菌的 $\alpha$ -KGDH 基因。并且给出下述步骤。

15 首先, 选择大肠杆菌和枯草芽孢杆菌 $\alpha$ -KGDH 的  $E_1$  亚基基因中有高度同源性的区段, 根据其两端的序列合成引物, 只要满足下列条件: 具有随机核苷酸组成, E + C 的含量约 50 %, 不形成特殊的二级结构, 相互之间不互补, 任何序列均可用作引物。常用 20 - 30 个核苷酸长的序列。特别地, 序列表 SEQ ID NOS: 3 和 4 中的序列用作例子。

20 其次, 利用聚合酶链式反应法 (PCR 法) 从引物和枯草芽孢杆菌染色体 DNA 制备含有部分枯草芽孢杆菌 $\alpha$ -KGDH 基因的探针。任何长度不小于 20 个核苷酸的探针均可应用, 不过, 探针长度最好不小于约 100 个核苷酸。探针最好具有与目的基因序列互补的核苷酸序列, 不过, 具有高度同源性的探针也可采用。

25 另一方面, 提取产 L-谷氨酸棒状细菌的染色体 DNA, 用限制性内切酶消化染色体 DNA 得到的 DNA 片段与载体相连接, 制备重组 DNA, 重组 DNA 用来转化大肠杆菌。可用例如 Bam HI, EcoRI, XhoI 的限制性内切酶。采用来源于大肠杆菌的载体, 如 pUC19 和 pBR322。任何适于载体复制的菌株均可用做重组 DNA 的受体菌株。例如可用大肠杆菌菌株如 HB101, JW109 和 DH5。

30 从这样得到的转化体中用菌落杂交手段选择与探针 DNA 杂交的菌株, 从该转化体中回收重组 DNA。分析与载体连接的产 L-谷氨酸棒

状杆菌染色体 DNA 的限制性内切酶片段的结构。

得到的 DNA 片段并不一定包含编码目的酶的基因的全长。这种情况下，用另一种限制性内切酶切割产 L - 谷氨酸棒状杆菌的染色体 DNA，并使之与载体连接。制备重组 DNA。重组 DNA 用来进行转化。  
5 用上面的方法利用菌落杂交选择并分析限制性内切酶片段。于是可得到含有  $\alpha$  - KGDH 基因全长的 DNA 片段。操作过程中，可方便地利用第一次得到的 DNA 片段作探针进行菌落杂交。

含有  $\alpha$  - KGDH 基因的 DNA 片段与另一适当载体重组后导入产 L - 谷氨酸棒状杆菌。可用的载体例如在棒状杆菌属细菌中自主复制的质粒。特别地，例子有 pAM330 (日本公开专利 58 - 67699 号)，pHM1519 (日本公开专利 58 - 77895 号)，pAJ655，pAJ611，pAJ1844 (日本公开专利 58 - 192900 号)，前三者，pCG1 (日本公开专利 57 - 134500 号)，pCG2 (日本公开专利 58 - 35197 号)，pCG4，pCG11 (日本公开专利 57 - 183799 号)，pHK4 (日本公开专利 5 - 7491 号) 等。  
10

15 为了通过将上述载体与产 L - 谷氨酸棒状杆菌  $\alpha$  - KGDH 基因相连接制备重组 DNA，事先用限制性内切酶切割载体。用来切割的限制性内切酶与用来切割染色体 DNA 的相同。备选地，用可产生与染色体 DNA 片段切割面互补的切割面的限制性内切酶来切割。通常用例如 74DNA 连接酶连接。

20 用迄今见于报道的转化方法将不同的重组 DNA 导入受体。例如对大肠杆菌 K - 12 报导有一种方法用氯化钙处理受体细胞增加 DNA 通透能力 (分子生物学杂志, 53, 159, (1970))。对枯草芽孢杆菌报导有一种方法用增殖期细胞制备转化态细胞以导入 DNA (C. H. 基因, 1, 153, (1977))。备选地，也可用一种方法将 DNA 受体细胞  
25 转化成可容易地导入重组 DNA 的原生质体或原生质状态后将重组 DNA 导入 DNA 受体，已知该法用于枯草芽孢杆菌、放线菌和酵母 (分子基因遗传学, 168, 111 (1979), Nature, 274, 398 (1978) 美国国家科学院院刊, 75, 1929 (1978))。

30 用原生质体方法，既使在上述用于枯草芽孢杆菌的方法的情况下也能得到足够高的频率，不过，日本公开专利 57 - 183799 号公开，也可利用一种方法，其中棒状杆菌属细菌细胞的原生质体接触二价金属离子和聚乙二醇与聚乙烯醇二者任一种的状态下导入 DNA。不加聚乙二醇



和聚乙烯醇而加入羧甲基纤维素、葡聚糖、Ficoll, Bruronic F68 (Selva 公司制造) 等也协助 DNA 导入。本发明实施例应用的转化方法是电脉冲法 (见日本公开专利 2 - 207791 号)。

5 这样得到的细菌菌株, 其中导入了含有来源于产 L - 谷氨酸棒状杆菌  $\alpha$  - KGDH 基因的重组 DNA 培养于含有碳源、氮源、无机盐和可选的有机微量营养的普通培养基。于是可以在细胞中高水平地生产具有  $\alpha$  - KGDH 活性的酶。

糖类如葡萄糖、蔗糖、糖蜜废料、淀粉水解物或有机酸如乙酸和柠檬酸, 以及醇类如乙醇用作碳源, 脲、铵盐、液氨、氨气等用作氮源, 10 磷酸盐、钾盐、镁盐、铁盐、锰盐等用作无机盐。氨基酸、维生素、脂肪酸、核酸以及含有它们蛋白胨、酵母提取物、大豆蛋白水解物等用作有机微量营养。

供氧条件下培养 10 - 40 小时, 温度 5 - 37 °C, pH 控制在 5 - 9。

培养完成后, 定量确定培养液中生产并积累的 L - 谷氨酸, 并测量 15 细菌细胞中  $\alpha$  - KGDH 活性水平。用农业生物化学, 44, 1897 (1980) 中描述的方法等测量活性: 通过离心等方法从培养物中回收的细菌细胞用超声处理 (Frech Prees 处理等粉碎, 然后离心去除细胞残片, 凝胶过滤去除小分子量物质得到测量用样本。

20 于是对含有扩增基因的产 L - 谷氨酸棒状杆菌和一种不含扩增基因的细菌研究  $\alpha$  - KGDH 活性水平与 L - 谷氨酸生产能力的关系。结果表明, 在由于基因扩增而  $\alpha$  - KGDH 活性水平升高的细菌中 L - 谷氨酸生产能力降低, 见下述参考实施例 1。

25 本发明的基因的利用包括通过插入药物相关基因等制备  $\alpha$  - KGDH 活性缺陷菌株, 通过修饰启动子等制备表达泄漏的菌株, 从而可能有效地培育一种细菌菌株, 其 L - 谷氨酸生产能力与普通产 L - 谷氨酸棒状杆菌相比进一步提高。

30 用利用化学试剂诱变的方法或基于基因重组的方法得到  $\alpha$  - KGDH 活性缺陷的菌株。然而在利用化学试剂引入突变的方法中, 获得  $\alpha$  - KGDH 活性降低的菌株相对容易, 获得该活性完全缺失的菌株难。为得到后一种菌株, 由于如上述  $\alpha$  - KGDH 基因的结构已阐明, 通过基因同源重组修饰或破坏染色体上  $\alpha$  - KGDH 基因, 这样的方法可能是有利的。通过同源重组破坏基因的方法已被建立, 可以用利用线性 DNA 的

方法, 利用温度敏感性质 的方法等。

特别地, 用定点突变生成方法 (Kramer, W 和 Frits. H. J., 酶学方法, 154, 350 (1987)) 或用化学试剂如次硫酸钠和羟胺处理 (Shortle, D 与 Nathans, D., 美国国家科学院院刊, 75, 270, (1978)) 在  $\alpha$ -KGDH 基因编码区或启动子区域的核苷酸序列中造成一个或多个核苷酸的替换、缺失、插入、增加或倒位。这样修饰或破坏的基因用来替代染色体上的正常基因。因而可能去除  $\alpha$ -KGDH 作为基因产物的活性或使  $\alpha$ -KGDH 基因不能转录。

定点突变生成方法利用一段合成寡聚核苷酸。该技术实现在可选的有限碱基对中引入可选的替换、缺失、插入、加入或倒位, 用该方法, 首先, 具有确定的 DNA 核苷酸序列的目的基因并被克隆的质粒变性, 制备单链。然后合成一段与将要产生突变的部分互补的合成寡聚核苷酸。不过, 合成寡聚核苷酸不该具有完全互补的序列, 而且有可选的核苷酸替换、缺失、插入、加入或倒位。单链 DNA 然后与具有可选的核苷酸替换、缺失、插入、加入或倒位的合成寡聚核苷酸退火。用 DNA 聚合酶 I 的 Klenow 片段和  $T_4$  连接酶合成完整的双链质粒。导入大肠杆菌的转化态细胞。这样得到的一些转化体含有其中可选核苷酸替换、缺失、插入、加入或倒位被固定的基因。一种能将突变引入基因来修饰或破坏的相似方法包括重组 PCR 方法 (PCR 技术, Stockton press (1989))。

另一方面, 利用化学试剂处理的方法中, 含有目的基因的 DNA 片段直接用次亚硫酸钠, 一羟胺等处理, 具有核苷酸替换、缺失、插入、加入或倒位的突变随机引入 DNA 片段。

用通过引入突变来修饰或破坏得到的基因替换产 L-谷氨酸棒状杆菌染色体上正常基因的方法包括利用同源重组的方法 (分子遗传学实验, 冷泉港实验室出版社 (1972)); Matsuyama, S. 和 Mizushima, S., 微生物学杂志, 162, 1196 (1985))。同源重组中, 含有一段与染色体上序列同源的序列的质粒等引入细菌细胞, 在有同源性的序列部分以一定频率发生重组, 引入的整个质粒就导入染色体。若后来在染色体上有同源性的序列部分进一步发生重组, 质粒又会从染色体上分离脱落。这时, 根据重组发生的位置, 带有引入突变的基因有时会固定到染色体上, 而原来的正常基因随质粒从染色体上去掉并脱落。选择这样的细菌

菌株，可得到细菌菌株，其中染色体上的一个正常基因被一个引入了核苷酸替换、缺失、插入、加入或倒位以修饰或破坏的基因所替代。

这样得到的 $\alpha$  - KGDH 活性缺陷的产 L - 谷氨酸棒状杆菌特别是含有过量生物素的培养基中比具有部分降低的 $\alpha$  - KGDH 活性的菌株有明  
5 显优异的 L - 谷氨酸生产能力。

为了利用 $\alpha$  - KGDH 活性缺陷的产 L - 谷氨酸棒状杆菌生产并积累 L - 谷氨酸，该细菌培养于含有碳源、氮源、无机离子和其它养分的液体培养基中。常规地，若培养在含有过量生物素的液体培养基中进行，有必要添加抑制生物素作用的物质，即青霉素如青霉素 G、F、K、  
10 O、V 或 X，或者富含脂肪酸的表面活性剂如蔗糖单软脂酰或聚氧乙烯甘梨糖单软脂酸或其衍生物，到培养基中，以高产率地生产 L - 谷氨酸。

然而，用本实验的 $\alpha$  - KGDH 活性缺陷的产 L - 谷氨酸棒状杆菌时，既使培养在含有 10-100  $\mu\text{g/l}$  的高浓度生物素的液体营养培养基中进行而不加任何上述抑制生物素作用的物质，生产和积累的 L - 谷氨酸也  
15 产率高，积累高。

换句话说，对碳源，亦可用富含生物素的原材料如甜马铃薯和甜菜的糖汁或糖蜜废料，除了（常用的）葡萄糖、果糖、糖化淀粉溶液，乙酸等。用于普通 L - 谷氨酸发酵的铵盐，液氨、氨气、脲等用作氮源。另外，视需要适当添加无机离子如磷酸盐和镁盐。视需要适当加微量养  
20 分如硫胺素到培养基中。

优选地在有氧条件下培养。培养过程中培养温度优选地控制在 24 - 42  $^{\circ}\text{C}$ ，pH 优选地控制在 5 - 9。无机或有机、酸性或碱性物质，以及脲、碳酸钙、氨气等用来调节 pH。

从培养液中收集 L - 谷氨酸的方法是适当地综合已知方法如离子交换树脂处理与结晶。  
25

为了提高 L - 谷氨酸生产能力，增强谷氨酸生物合成的基因是有利的。增强谷氨酸生物合成系统基因的例子包括糖酵解途径中的磷酸果糖激酶（PFK，日本公开专利 63 - 102692 号），回补途径中的磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶（PEPC，日本公开专利 60 - 87788 和 62 - 55089 号），  
30 TCA 循环中的柠檬酸合成酶（CS，日本公开专利 62 - 201585 和 63 - 119688 号），顺乌头酸水解酶（ACO，日本公开专利 62 - 294086 号），异柠檬酸脱氢酶（ICDH，日本公开专利 62 - 166890 和 63 - 214189

号)。胺化反应的谷氨酸脱氢酶 ( GDH , 日本公开专利 61 - 268185 号) 等。

为得到上述基因, 可用下述方法。

( 1 ) 对于一突变株, 其中一目的基因发生突变并表达特定性状, 5 得到一突变株, 其中由于引入目的基因该性状消失。从棒状杆菌染色体得到与突变株性状互补的基因。

( 2 ) 若目的基因已由另一生物体获得并已阐明其核苷酸序列, 利用具有高度同源性的区域的 DNA 作探针用杂交技术得到目的基因。

( 3 ) 若目的基因的一段核苷酸序列在细节上已相当清楚, 用 PCR 10 方法 ( 聚合酶链式反应方法 ) 利用棒状杆菌染色体做模板得到含有目的基因的基因片段。

上述方法可用于获得此处应用的染色体。只要适用于上述方法应用的棒状杆菌, 任何宿主 - 载体系统无可应用。在本发明的实施例中利用上述方法 ( 3 ), 它当核苷酸序列已阐明时有效。

15 若用上述方法 ( 2 ) 和 ( 3 ) 得到基因, 而目的基因原来没有启动子, 可以将在棒状杆菌中具有启动子活性的 DNA 片段插入目的基因上游某一位置来表达目的基因。为了增强目的基因的表达可以将目的基因连到强启动子下游某一位置。在棒状杆菌中起作用的强启动子包括大肠杆菌的 lac 启动子 tac 启动子, trp 启动子等 ( Y. Morinaga, M. Tsuchiya, 20 K. Miwa 和 K. Sano, J. Biotech., 5, 305-312( 1987 ) ), 此外, 棒状杆菌属细菌的 trp 启动子也是优选的启动子 ( 日本公开专利, 62 - 195294 号 )。在本发明的实施例中, 棒状杆菌的 trp 启动子用于表达 PEPC 基因。

本发明的  $\alpha$  - KGDH 基因的扩增有利于在具有 L - 赖氨酸生产能力的棒状杆菌中提高其生产能力。

25 迄今有多种人工突变株用做产 L - 赖氨酸细菌。用它们作宿主以携带本发明的重组 DNA 可提高其 L - 赖氨酸生产能力, 这样的人工突变株包括: 对 S ( 2 - 氨基乙基 ) - 半胱氨酸 ( 以后缩写为 “ AEC ” ) 有抗性的突变株; 生长需要氨基酸如 L - 高丝氨酸的突变株 ( 日本专利出版物 48 - 28078 和 56 - 6499 号 ); 对 AEC 表现抗性并需要氨基酸如 L 30 - 亮氨酸, L - 高丝氨酸, L - 脯氨酸, L - 丝氨酸, L - 精氨酸, L - 丙氨酸和 L - 缬氨酸的突变株 ( 美国专利 3,708,395 和 3,825,472 号 ); 对 DL -  $\alpha$  - 氨基 -  $\epsilon$  - ( 己内酰胺,  $\alpha$  - 氨基 -  $\omega$  - 十二碳内酰胺, 天冬

氨酸类似物，磺胺药物，醌和 N - 月桂酰亮氨酸表现抗性的产 L - 赖氨酸突变株；对草酰乙酸脱羧酶或呼吸系统酶的抑制剂表现抗性的产 L - 赖氨酸酶（日本公开专利 50 - 53588，50 - 31093，52 - 102498，53 - 9394，53 - 86089，55 - 9783，55 - 9759，56 - 32995，56 - 39778 号和日本专利出版物 53 - 43591，53 - 1833 号）；需要肌醇或乙酸的产 L - 赖氨酸突变株（日本公开专利 55 - 9784 和 56 - 8692 号）；对氟丙酮酸敏感或温度不能低于 34 °C 的产 L - 赖氨酸突变株（日本公开专利 55 - 9783 和 53 - 86090 号）；对乙二醇表现抗性并生产 L - 赖氨酸的短杆菌或棒状杆菌的突变株（见美国专利 4, 411, 997 号）等。

特别地，举下列菌株为例。

乳发酵短杆菌 AJ 12031（FERM - BP 277，特开昭 60 - 62994 公报）

乳发酵短杆菌 ATCC 39134（特开昭 60 - 62994 公报）

谷氨酸棒状杆菌 AJ 3463（FERM - P 1987，特公昭 51 - 34477 公报）

乳发酵短杆菌 AJ 12435（FERM - BP - 2294 美国专利 5,304,476）

乳发酵短杆菌 AJ 12592（FERM - BP - 3239 美国专利 5,304,476）

谷氨酸棒状杆菌 AJ 12596（FERM - BP - 3242 美国专利 5,304,476）

可通过与上述适当载体连接将  $\alpha$  - KGDH 基因导入这样的产 L - 赖氨酸细菌。

用于 L - 赖氨酸生产的培养基是含有碳源、氮源、无机离子和可选的其它有机微量养分的普通培养基。糖类如葡萄糖、乳糖、半乳糖、果糖和淀粉水解物，醇类如乙醇和肌醇，有机酸如乙酸、延胡索酸、柠檬酸和琥珀酸用作碳源。无机铵盐如硫酸铵，氯化铵和磷酸氨，有机氮如大豆水解物，氨气，液氨等用作氮源。小量的磷酸钾，硫酸镁，铁离子，锰离子等加入用作无机离子。适量的必需物质如维生素 B<sub>1</sub>。酵母提取物等如需要最好也包括在内，用作有机微量养分。

优选地在有氧条件下培养 16 - 72 小时，培养过程中培养温度控制

在 30 - 45 °C, pH 控制在 5 - 8.5, 无机或有机、酸性或碱性物质, 以及氨气可用于调整 pH。

通常可通过综合已知方法如离子交换树脂法、沉淀法等从发酵液中收集 L - 赖氨酸。

5

### 附图简述

图 1 是含有  $\alpha$  - KGDH 基因的 DNA 片段的限制性内切酶图谱。

### 优选实施方案描述

本发明将在下面参考实施例更清楚地说明。对限制性内切酶, 用商业产品 (酒宝造公司制造)

### 10 实施例 1: $\alpha$ - KGDH 基因的分离与结构确定

#### (1) 制备探针

选择大肠杆菌和枯草芽孢杆菌  $\alpha$  - KGDH 的 E<sub>1</sub> 亚基基因之间有高度同源性的区域, 磷酸胺法用 DNA 合成仪 (Model 394, 应用生物系统制造) 合成序列表中 SEQ ID NOS. 3 和 4 给出的寡聚核苷酸。

15 寡聚核苷酸 (0.25  $\mu$  mole) 作引物, 枯草芽孢杆菌 NA64 的染色体 DNA (0.1  $\mu$ g) 用普通方法制备 (该菌株得自 Bacillus Genetic Stock Center (Ohio 大学, 美国) 作模板, Taq DNA 聚合酶 (2.5 单位) (酒宝造公司制造) 加到 0.1ml 的 10mM Tris - HCl 缓冲液 (pH8.3) 中, 缓冲液含有 dATP, dCTP, dGTP, dTTP 各 200  $\mu$ M, 50mM 氯化钾, 1.5mM 氯化镁和 0.0001% 明胶。用 PCR 方法, 每轮包括 94 °C 1 分钟, 55 °C 分钟  
20 2 分钟, 72 °C 3 分钟, 重复 30 次。反应溶液走琼脂糖凝胶电泳, 目的 DNA 片段用玻璃粉 (酒宝造公司制造) 回收。用 Klenow 片段 (Amersham 制造) 和 [ $\alpha$ -<sup>32</sup>dCTP] (Amersham 制造) 以普通方法标记 DNA 片段, 用作探针。

### 25 (2) 乳酸发酵短杆菌 ATCC 13869 染色体 DNA 片段的制备

乳酸发酵短杆菌 ATCC 13869 接种到 500ml 含 1 % 细菌培养用胰蛋白胨 (Difco 制造), 0.5 % 细菌培养用酵母提取物 (Difco 制造) 和 0.5 % 氯化钠的 F - Y 培养基 (pH7.2)。31.5 °C 培养 6 小时得到培养物。培养物 5000 vpm 离心 10 分钟, 得到 2g 湿细胞沉淀物。

30 用 Saito 和 Miura 的方法 (Biochem. Biophys. Acta., 72, 619 (1963)) 从细胞片状沉淀物中提取染色体 DNA。染色体 DNA (2  $\mu$ l) 和限制性内切酶 EcoRI (200 单位) 分别与 50mM 含有 10mM 氯化镁, 100mM

氯化钠和 1mM 二硫苏糖醇的 Tris - HCl 缓冲液 ( pH7.5 ) 混合, 37 °C 反应 15 小时。反应结束后, 用普通方法将溶液酚提取处理, 并乙醇沉淀处理得到 EcoRI 消化的乳酸发酵短杆菌 ATCC 13869 染色体 DNA 片段。

### ( 3 ) 乳酸发酵短杆菌 ATCC 13869 $\alpha$ - KGDH 基因的分离

- 5 质粒载体 pUC18 ( 酒宝造公司制造 ) ( 1 $\mu$ g ) 和限制性内切酶 EcoRI ( 20 单位 ) 与 50mM 含有 10mM 氯化镁, 100mM 氯化钠和 1mM 二硫苏糖醇的 Tris - HCl 缓冲液 ( pH7.5 ) 混合。用普通方法对溶液酚抽提和乙酸沉淀。然后, 为防止来源于质粒载体的 DNA 片段重新连接, 用分子克隆, 第二版 ( J. Sambrook, E. F. Fritsch 和 T. Maniatis, 冷泉港实验室出版社, pl. 60 ( 1989 ) 的方法用细菌碱性磷酸酶处理将 DNA 片段脱磷, 接着用普通方法酚抽提和乙醇沉淀。

- 15 用 EcoRI 消化的 pUC 18 ( 0.1 $\mu$ g ), 第 ( 2 ) 步得到的用 EcoRI 消化的乳酸发酵短杆菌 ATCC 13869 染色体 DNA 片段 ( 1 $\mu$ g ) 和 74DNA ( 1 单位 ) ( Takara Shuzo Co. Ltd. 制造 ) 加到含有 6.6mM 氯化锰, 10mM 二硫苏糖醇和 10mM 三磷酸腺苷的 66mM Tris - HCl 缓冲液 ( pH7.5 ), 16 °C 反应 8 小时连接 DNA。然后 DNA 混合物用来用普通方法转化大肠杆菌 JM109 ( Takara Shuzo Co., Ltd. 制造 )。将细菌铺到含 100 $\mu$ g/ml 氨苄青霉素的 L 琼脂培养基, 得到约 10,000 转化体。

- 20 用分子克隆, 第二版 ( J. Sambrook, E. F. Fritsch 和 T. Maniatis, 冷泉港实验室出版社, pl. 90 ( 1989 ) 的方法与第 ( 1 ) 步得到的探针 DNA 杂交, 从得到的转化体中筛选出一个转化体。

### ( 4 ) 乳酸发酵短杆菌 ATCC 13869 $\alpha$ - KGDH 基因核苷酸序列的确定

- 25 用分子克隆, 第二版 ( J. Sambrook, E. F. Fritsch 和 T. Maniatis, 冷泉港实验室出版社, pl. 25 ( 1989 ) 中碱性细菌水解方法从第 ( 3 ) 步得到的转化体体制取质粒 DNA, 质粒 DNA 含有来源于乳酸发酵短杆菌 AT 13869 染色体 DNA 的约 6 千碱基的 DNA 片段。在 ( 3 ) 中反应组成用限制性内切酶 EcoRI 和 XhoI 消化质粒, 然后用普通方法琼脂糖凝胶电泳。与 ( 3 ) 相同进行 Southern 杂交确定与探针 DNA 杂交的片段。结果表明一段用 EcoRI 和 XhoI 消化的约 3 千碱基的切割片段杂交。如
- 30 ( 3 ) 那样, 该 DNA 片段与用 EcoRI 和 XhoI 消化的质粒载体 pHS 397 ( Takara Shuzo Co., Ltd. 制造 ) 连接并克隆。得到的质粒 DNA 用来确定 DNA 片段的核苷酸序列。用 Sanger 的方法 ( J. Mol. Biol, 143, 161

(1980)用 Taq DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing 试剂盒 (应用生物系统制造) 确定核苷酸序列。

由于得到的 DNA 片段不含有完整的开放阅读框架, 用 XhoI 切割乳酸发酵短杆菌 ATCC 13869 的染色体 DNA, 将它与 pHSG 397 连接, 如 (3) 那样, 得到重组质粒, 用重组质粒进行转化。用 (1) 的方法将从 (2) 得到的来源于乳酸发酵短杆菌 ATCC 13869 染色体 DNA 的约 3 千碱基 EcoRI - XhoI 切割片段标记, 得到的探针用来筛选杂交转化体。得到的转化体所携带的质粒含有一段约 6 千碱基的 DNA 片段。含有该 DNA 片段的基因的限制性图谱由图 1 给出。用 (3) 的反应组分用限制性内切酶 Sall 和 XhoI 消化质粒, 然后用普通方法琼脂糖凝胶电泳, 用 (3) 的方法确定杂交片段。结果发现一段约 4.4 千碱基的片段。用如 (3) 那样 Sall 和 XhoI 消化的质粒载体 pHSG 397 与 DNA 片段连接并克隆。该质粒命名为 pHSG - X。用与上述相同的在确定质粒中 Sall - XhoI 切割片段从 Sall 切割位点到 EcoRI 切割位点约 1.4 千碱基的 DNA 片段的核苷酸序列。

得到的 Sall - XhoI 切割基因片段的核苷酸序列由序列表中 SEQ ID NO: 1 给出。估计有开放阅读框架, 由该核苷酸序列得到的一种产品的氨基酸序列由序列表中 SEQ ID NOS: 1 和 2 给出。即, 编码含有序列表中 SEQ ID NO: 1 给出的氨基酸序列的蛋白质的基因是乳酸发酵短杆菌 ATCC 13869 的  $\alpha$  - KGDH 基因。蛋白质 N 末端的蛋氨酸来源于作为起始密码子的 ATG, 因此它与蛋白质原来的功能常无关。众所周知翻译后该蛋氨酸残基被肽酶作用去除。相应地, 上述蛋白质也可能以蛋氨酸残基去除形式出现。

该核苷酸序列和氨基酸序列就同源性分别与已知序列比较。所用数据库为 EMBL 和 SWISS - PROT。结果表明序列表 SEQ ID NO: 1 给出的 DNA 及其编码的蛋白质是棒状杆菌中的新基因和新蛋白质。与已报导的大肠杆菌和枯草芽孢杆菌的 E1 亚基基因及其编码蛋白质有同源性。

本发明的基因编码的蛋白质有 1,257 个氨基酸 N - 末端有蛋氨酸残基, 与已报导的  $\alpha$  - KGDH 特征明显不同。也就是说, C 末端的约 900 个氨基酸与各种 E1 亚基有高度同源性。然而, N 末端的 300 个氨基酸不见于其它种的  $\alpha$  - KGDH, 这表明本发明的蛋白质有特殊的功能。将 N - 末端 300 个氨基酸的部分与已知序列进行同源性比较, 发现该部分



与大肠杆菌和固氮菌属细菌的 E<sub>2</sub> 亚基有同源性。这说明有可能本发明的蛋白质与其它种的  $\alpha$  - KGDH 不同, 兼具 E<sub>1</sub> 和 E<sub>2</sub> 的活性。

另外, 与见于大肠杆菌的普通启动子序列相似的序列 ( 281 - 286 和 307 - 312 ) 以及与棒状杆菌核糖体结合序列相似的序列 ( 422 - 428 ) 在本发明的基因的开放阅读框架上游找到。与转录终止信号相似的基环结构 ( 4243 - 4281 ) 在本发明的基因的开放阅读框架下游找到。这些序列表明本发明的基因独立地转录和翻译并具有与其它种  $\alpha$  - KGDH 不同的遗传结构。

10 实施例 2: 通过来源于乳酸发酵短杆菌 ATCC 13869 的  $\alpha$  - KGDH 基因的表达增加  $\alpha$  - KGDH 活性

( 1 ) 将  $\alpha$  - KGDH 基因导入乳酸发酵短杆菌 ATCC 13869 和 AJ11060

实施例 ( 1 ) 得到的 pHS GS - X 质粒 DNA ( 1  $\mu$ g ) 和限制性内切酶 SalI 和 XhoI ( 各 20 单位 ) 混合于实施例 ( 1 ) 中 ( 3 ) 的缓冲液, 37  $^{\circ}$ C 反应 3 小时。另一方面, 在短杆菌属细菌中自主转录的质粒 pPK4 ( 参  
15 考日本公开专利 5 - 7491 号 ) DNA ( 1  $\mu$ g ) 和 SalI ( 20 单位 ) 混合于实施例 1 中 ( 3 ) 的缓冲液中, 37  $^{\circ}$ C 反应 3 小时。用普通方法对两种反应溶液进行酚抽提与乙醇沉淀。然后, 为防止来源于质粒载体的 DNA 片段重新连接, 用实施例 1 ( 3 ) 的方法用细菌碱性磷酸酶处理将 DNA 片段去磷酸化, 接着用普通方法酚抽提和乙醇沉淀。 SalI 消化的 pPK4  
20 ( 0.1  $\mu$ g ), 由上述得到的 SalI - 和 XhoI 消化的 pHS GS - X pHS GS - X 质粒 DNA ( 0.5  $\mu$ g ) 和 T4 DNA 连接酶 ( Takara Shuzo Co., Ltd. 制造 ) 混合于实施例 1 ( 3 ) 的缓冲液中, 16  $^{\circ}$ C 反应 8 小时以连接 DNA。接下来, 用普通转化方法用电脉冲法 ( 日本公开专利 2 - 207791 号 ) 将 DNA 混合物导入乳酸发酵短杆菌 AJ11060 ( 日本专利出版物 59 - 10797 号 )。  
25 得到的溶液铺到含有 1 % 多聚蛋白胨, 1 % 酵母提取物, 0.5 % 氯化钠, 0.5 % 葡萄糖和 25  $\mu$ g/ml 卡那霉素的琼脂培养基上得到转化体 AJ11060/pPKS-X。该转化体命名为乳酸发酵短杆菌 AJ12999, 于 1994 年 6 月 3 日贮存于通商产业省工业技术院生命工学工业技术研究所, 贮存号 FERMP - 14349, 并根据布达佩斯条约 ( 协定 ) 于 1995 年 6 月 2  
30 日从原贮存处转到国际贮存处, 贮存号 FERMBP - 5123。

依据实施例 1 ( 4 ) 从得到的转化体提取质粒 DNA, 用普通方法进行琼脂糖凝胶电泳。于是选择到来源于乳酸发酵短杆菌 ATCC 13869 的

SalI 和 XhoI 片段与质粒 pPK4 连接的重组 DNA。得到的质粒命名为 pPKS-X。

用乳酸发酵短杆菌 ATCC 13869 用同样方法得到转化体 ATCC 13869/pPKS-X。

## 5 (2) 带有扩增 $\alpha$ - KGDH 基因的菌株的酶活性

(1) 中得到的乳酸发酵短杆菌 AJ 11060/pPKS-X 和 ATCC 13869/pPKS-X 接种到 50ml 含有 8 % 葡萄糖, 0.1 % 磷酸二氢钾, 0.004 % 硫酸镁, 3 % 硫酸铵, 0.001 % 硫酸亚铁, 0.001 % 硫酸锰, 0.05 % 大豆水解物溶液, 200  $\mu$ g/l 维生素 B<sub>1</sub>, 300  $\mu$ g/l 生物素, 5 % 碳酸钙和 25mg/l 卡那霉素的培养基 (pH8.0), 31.5  $^{\circ}$ C 培养 18 小时。用普通方法离心培养液, 收集细胞沉淀物。

将细胞沉淀物悬浮于 0.2 % 氯化钾溶液, 离心, 重复操作两次清洗细胞沉淀物。细胞沉淀物用含有 30 % 甘油的 N - Tris (羟甲基) 甲基 - 2 - 氨基乙磺酸 (以后称为 TES) 的 0.1M 缓冲液 (pH7.7), 超声处理, 然后 15,000vpm 离心 30 分钟得到上清。该细胞裂解物进行 Sephadex E-15 (Pharmara 制造) 柱层析, 去除低分子量物质, 制备粗酶溶液。

得到的粗酶溶液的  $\alpha$  - KGDH 活性利用 Agric. Biol. Chem., 44, 1987(1980) 描述的反应溶液组分根据 365nm 3 - 乙酰嘌呤腺嘌呤二核苷酸吸收增加来测量。使用 Bio-Rad 制造的试剂盒以牛血清清蛋白为标准测量粗酶溶液的蛋白质浓度, 并计算酶的比活。作为对照, 用同样方法确定用质粒 pPK4 转化得到的 AJ11060/pPK4 和 ATCC 13869/pPK4 的比活。结果由表一给出。AJ11060/pPKS-X 和 ATCC 13869/pPKS-X 的比活分别是 AJ11060/pPK4 和 ATCC 13869/pPK4 的比活的两倍或更多。结果证明得到的基因片段编码具有  $\alpha$  - KGDH 活性的酶。

表 1

细菌菌株	$\alpha$ - KGDH 比活 ( $\Delta$ 吸收/分钟/mg 蛋白)
AJ11060 /pPK4	0.029
AJ11060 /pPKS-X	0.055
ATCC 13689 /pPK4	0.019
ATCC 13689 /pPKS-X	0.060

粗酶溶液的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳结果观察到约 135 千道尔顿的带的扩增对应于所得基因预计的分子量为 139 千道尔顿的酶。这表明所得基因确实在转化菌株内表达。

# 5      参考例 1: $\alpha$ - KGDH 活性与 L - 谷氨酸生产能力的关系

乳酸发酵短杆菌 AJ11060/pPK4 和 AJ11060/pPKS-X 培养于产 L - 谷氨酸培养基, 测量生产并积累于培养液中的 L - 谷氨酸。如下用加入表面活性剂的方法进行培养。

含有 8 % 葡萄糖, 0.1 % 磷酸二氢钾, 0.004% 硫酸镁, 3 % 硫酸铵, 1.5% 大豆水解物溶液, 200 $\mu$ g/l 盐酸硫胺素, 300 $\mu$ g/l 生物素, 25mg/l 卡那霉素和 5 %  $\text{CaCO}_3$  ( 分别灭菌 ) 的生产培养基 ( pH8.0 , 20ml ) 配好后倒入容积 500ml 的坂口烧瓶, 加热灭菌。先前由分别培养于含有 1 % 多聚蛋白胨 ( 日本制药公司制造 ) 1 % 细菌培养用酵母提取物 ( Difco 制造 ), 0.5% 氯化钠, 0.5% 葡萄糖和 25mg/l 卡那霉素的平板培养基 ( pH7.2 ) 的 AJ11060/pPK4 和 AJ11060/pPKS-X 得到的细菌细胞接种到该培养基中, 31.5  $^{\circ}\text{C}$  振荡培养 18 小时, 得到种培养物。

得到的种培养物按 5 % 量接种到加了 3g/l 表面活性剂 ( Tween40:Sigma 制造 ) 的生产培养基和不加表面活性剂的生产培养基, 用同样方法 31.5  $^{\circ}\text{C}$  培养 20 小时。

20      培养完毕, 用旭化成公司制造的 Biotech Analyser As - 210 测量培养液中积累的 L - 谷氨酸的量及剩余的葡萄糖浓度。将培养物用 0.02N 盐酸稀释至 51 倍得到的溶液测 620 nm 吸收, 确定细菌细胞的生长量。结果由表 2 给出。

表 2

25

<u>菌株</u>	<u>表面 活性剂</u>	<u>生长量 (OD)</u>	<u>残留的糖 ( g/dl )</u>	<u>积累量 ( g/dl )</u>	<u>产率 ( % )</u>
AJ11060 / pPK4	-	1.72	0.45	0	0
	+	0.78	1.80	2.46	42.4
AJ11060 / pPKS-X	-	1.31	1.89	0	0
	+	0.78	3.69	0.37	9.4

在未加表面活性剂的培养基中任何细菌菌株均未发现有 L - 谷氨酸的生产。只有当加入表面活性剂后培养液中才生产并积累 L - 谷氨酸。本实验中, 在导入了含有  $\alpha$  - KGDH 基因的 pPKS-X 质粒的菌株中, 比作为对照的导入 pPK4 的菌株 L - 谷氨酸产率显著降低。该事实表明加入表面活性剂后  $\alpha$  - KGDH 活性水平强烈影响 L - 谷氨酸的生产。

#### 参考例 2: 用添加青霉素法比较 L - 谷氨酸生产能力

用添加青霉素法研究  $\alpha$  - KGDH 基因扩增对 L - 谷氨酸生产的效应。

用与参考实施例 1 相同的方法制备种培养物, 种培养物分别接种到加了 0.4 单位/ml 青霉素的生产培养基和不加青霉素的生产培养基, 使细胞片状沉淀物干重约为 2 %, 31.5 °C 振荡培养 25 小时。

培养完毕, 用跟参考实施例相同的方法测量培养液中积累的 L - 谷氨酸的量及残留葡萄糖浓度。结果由表 3 给出。结果显示加入青霉素后  $\alpha$  - KGDH 活性水平强烈影响 L - 谷氨酸的生产。

表 3

菌株	青霉素	生长量 (OD)	残留的糖 ( g/dl )	积累量 ( g/dl )	产率 ( % )
AJ11060 /pPK4	-	1.84	0.0	0	0
	+	0.72	0.0	3.90	49.2
AJ11060 / pPKS-X	-	1.87	0.0	0	0
	+	1.07	0.0	2.39	30.1

#### 实施例 3: $\alpha$ - KGDH 基因缺陷菌株的制备

根据 L - 谷氨酸的生产被  $\alpha$  - KGDH 基因扩增抑制这一事实, 预期相反地, 破坏  $\alpha$  - KGDH 基因应能提高 L - 谷氨酸产率。利用日本公开专利 5 - 7491 号描述的温度敏感型质粒用同源重组方法得到基因破坏的菌株。特别地, 该  $\alpha$  - KGDH 基因含有两个被 KpnI 在序列表中 SEQ ID NO:1 的第 1340 和 3266 位消化的位点。实施例 ( 1 ) 得到的 pHSGS-X 用 KpnI 部分消化, 然后自连接制备缺陷 1926 个碱基对的 KpnI 片段的质粒 pHSGS-X $\Delta$ K。pHSGS-X $\Delta$ K 的  $\alpha$  - KGDH 基因结构上缺少中间部分。

下一步，将一种得自在棒状杆菌中自主复制并具有温度敏感型自主复制能力的质粒的突变型复制原点导入 pHSGS-XΔK 的 BamHI 识别位点制备质粒 pBTS-XΔK。特别的，一种得自在棒状杆菌中自主复制并具有温度敏感型自主复制能力的质粒的质粒 pHSC4(日本公开专利 5 - 7491 号)。用限制性内切酶 KpnI 消化。用 DNA 平末端形成试剂盒(酒宝造公司制造，Blunting 试剂盒)得到平末端，然后与 BamHI 衔接物连接(酒宝造公司制造)。自连接得到一质粒，用限制性内切酶 BamHI 消化制备含有具有温度敏感型自主复制能力的突变型复制原点的基因片段。该基因片段导入 pHSGS-XΔK 的 BamHI 位点制备质粒 pBTS-XΔK。

10 用电脉冲法(日本公开专利 2 - 207791 号)将该质粒导入作为产 L - 谷氨酸棒状杆菌的野生菌株的乳酸发酵短杆菌 ATCC 13869，用日本公开专利 5 - 7491 号描述的方法将染色体上  $\alpha$  - KGDH 基因由缺陷型替代。特别地，导入了质粒的 ATCC 13869/pBTS-XΔK 25 °C 在 CM2G 液体培养基(1 % 多聚蛋白胨，1 % 酵母提取物，0.5%NaCl，0.5%葡萄糖，pH7.2)中振荡培养 6 小时，然后铺到含有 5 $\mu$ g/ml 氯霉素的 CM2G 琼脂培养基上，34 °C 培养形成菌落，得到质粒导入的菌株。用复制板法从众菌株中得到 34 °C 对氯霉素敏感的菌株。用敏感型菌株研究染色体上  $\alpha$  - KGDH 基因的核苷酸序列，说明  $\alpha$  - KGDH 基因已替换成缺陷型。该菌株命名为  $\Delta$ S 菌株。用实施例 2 描述的方法测量  $\Delta$ S 菌株的  $\alpha$  - KGDH 活性未检测到任何活性。

15 20

#### 实施例 4：制备用于扩增 *gdh*, *gltA* 和 *icd* 基因的质粒

##### (1) *gdh*, *gltA* 和 *icd* 基因的克隆

用 PCR 方法克隆乳酸发酵短杆菌的 *gdh*, *gltA* 和 *icd* 基因。在已报导的谷氨酸棒状杆菌的 *gdh* 基因(分子微生物学, 6 (3), 317-326 (1992)), *gltA* 基因(微生物学, 140, 1817-1828 (1994)). 和 *icd* 基因 (J. Bacteriol., 177, 774 - 782 (1995))的序列的基础上合成用于 PCR 方法的引物。序列表中 SEQ ID NOS: 5 (5'段)和 6 (3'段)给出的寡聚核苷酸用作扩增 *gdh* 基因的引物，SEQ ID NOS: 7 (5'段)和 8 (3'段)给出的寡聚核苷酸用作扩增 *gltA* 基因的引物，SEQ ID NOS: 9 (5'段)和 10 (3'段)给出的寡聚核苷酸用作扩增 *icd* 基因的引物，上述引物分别合成并应用。

25 30

用实施例 1 的方法从乳酸发酵短杆菌 ATCC 13869 制备染色体

DNA，用作模板用前述寡聚核苷酸作引物进行 PCR。得到的扩增产物用商业上可购得的 DNA 平末端形成试剂盒（酒宝造公司制造，Blunting 试剂盒）在两端得到平末端，然后克隆到载体质粒 pHSG 399（酒宝造公司制造）的 Sam I 位点，分别得到质粒 pHSG-gdh, pHSG-gltA, 和 pHSG-icd。

## （2）ppc 基因的克隆与表达

用实施例 1 的方法制备乳酸发酵短杆菌 ATCC 13869 的染色体 DNA，用作模板利用 PCR 方法得到含有编码 PEPC 的 ppc 基因的约 3.4Kbp 的 DNA 片段。在已报导的谷氨酸棒状杆菌的 ppc 基因序列的基础上（基因，77, 237-251（1989）合成用于 PCR 方法的引物，与上述相同程序进行 PCR 反应。引物序列由 SEQ ID NOS:11（5'段）和 12（3'段）给出。

PCR 反应的扩增产物用限制性内切酶 SalI（酒宝造公司制造）消化，再插入质粒 pHSG 399 的 Sal I 位点，得到质粒 pHSG-ppc'。pHSG-ppc' 的 PEPC 基因插入方法与 pHSG 399 的 lac 启动子方向相反。

下一步，将一种能在乳酸发酵短杆菌中起作用的色氨酸操纵子的启动子（基因，53，191-200（1987）插入 pHSG - ppc' 上 ppc 基因的上游位置。已知该启动子具有序列中 SEQ ID NO: 13 给出的含有 51 个核苷酸的序列，并表现活性。合成具有 SEQ ID NO: 13 给出的序列的核苷酸链和具有 SEQ ID NO: 14 序列的核苷酸链作为其互补链，得到具有启动子活性并且其两端对应限制性内切酶 KpnI 和 XbaI 的切割片段的含有 51 个碱基对的双链 DNA。

两条合成 DNA 混合浓度各为 10 pmol / $\mu$ g, 100 °C 加热 10 分钟，静置室温冷却退火。pHSG - ppc' 用限制性内切酶 KpnI 和 XbaI（酒宝造公司制造）消化，与上述启动子连接。用酒宝造公司制造的连接试剂盒进行连接反应。于是得到质粒 pHSG-ppc, 其中一拷贝的色氨酸操纵子启动子插入到 ppc 基因的上游位置。

## （3）通过连接三种基因 gdh, gltA 和 icd 构建的质粒的制备

连接三种基因 gdh, gltA 和 icd 制备一质粒。特别的，质粒 pHSG-gdh 用限制性内切酶 EcoRI 消化，购得的 DNA 平末端形成试剂盒（酒宝造公司制造，Blunting 试剂盒）得到平末端，然后与上述两端平末端化的 gltA 基因的 PCR 扩增产物连接得到质粒 pHSG-gdh+gltA。接下来，质粒

pHSG-gdh+gltA 用限制性内切酶 KpnI 消化。用同样方法得到平末端，与上述两端平末端化的 icd 基因的 PCR 扩增产物连接得到质粒 pHSG-gdh+gltA+icd。

(4) 通过连接三种基因 gdh, gltA 和 ppc 构建的质粒的制备

- 5 连接三种基因 gdh, gltA 和 ppc 制备一质粒。特别的，质粒 pHSG-gdh+gltA 用限制性内切酶 KpnI 消化。质粒 pHSG-ppc 用限制性内切酶 KpnI 和 Sall 消化得到在上游位置具有色氨酸操纵子启动子的 ppc 基因片段。得到的片段用 DNA 平末端形成试剂盒（酒宝造公司制造，Blunting 试剂盒）得到平末端，然后用 Kpn I 衔接物（酒宝造公司制造）将其插入质粒 pHSG-gdh+gltA 的 KpnI 位点，得到质粒 pHSG-gdh+gltA+ppc。
- 10

(5) 将棒状杆菌的复制原点导入上述质粒

- 为使 pHSG-gdh, pHSG-gltA, pHSG-ppc, pHSG-icd, pHSG-gdh+gltA+icd 和 pHSG-gdh+gltA+ppc 在棒状杆菌细胞中自主复制，将已得到的来源于在棒状杆菌中自主复制的质粒 pHM1519(Agric. Biol. Chem., 48, 2901-2903 (1984) 的复制起点（日本公开专利 5 - 7491 号）导入 pHSG-gdh, pHSG-gltA, pHSG-ppc, pHSG-icd, pHSG-gdh+gltA+icd 和 pHSG-gdh+gltA+ppc。特别的具有来源于 pHM1519 的复制起点的质粒 pHK4（日本公开专利 5 - 7491 号）用限制性内切酶 BamHI 和 KpnI 消化，得到含有复制起点的基因片段。得到的片段用 DNA 平末端形成试剂盒（酒宝造公司制造，Blunting 试剂盒）得到平末端，然后用 Kpn I 衔接物（酒宝造公司制造）分别插入 pHSG-gdh, pHSG-gltA, pHSG-ppc 和 pHSG-icdh 的 KpnI 位点，得到 pGDH, pGLTA, pPPC 和 pICD。接下来，相似地用 Sall 衔接物（酒宝造公司制造）将来源于 pHM1519 的复制起点分别插入到 pHSG-gdh+gltA+icd 和 pHSG-gdh+gltA+ppc 的 Sall 位点，
- 15
- 20 得到 pGDH+GLTA+ICD 和 pGDH+GLTA+ppc。另外，相似地用 Sal I 衔接物（酒宝造公司制造）将来源于 pHM1519 的复制起点插入不含这些基因的质粒 pHSG 399 的 Sall 位点，制备 pSAC4 作为对照。
- 25

实施例 7: pGDH, pGLTA, pPPC, pICD, pGDH+GLTA+ICD  
和 pGDH+GLTA+PPC 各基因的表达的确定

- 30 pGDH, pGLTA, pPPC, pICD, pGDH+GLTA+ICD 和 pGDH+GLTA+PPC 上各基因在乳酸发酵短杆菌细胞中是否表达，以及这些质粒是否进行基因扩增得到确定。特别地用电脉冲法（日本公开专利 2 - 207791 号）将

各质粒导入乳酸发酵短杆菌 ATCC13869。得到的转化体用 1 升纯水中含有 10g 多聚蛋白胨, 10g 酵母提取物, 5g 葡萄糖, 5g NaCl 和 15g 琼脂 (pH7.2) 以及 4 $\mu$ g/ml 氯霉素的 CM2G 平板培养基进行选择。得到的转化体培养于 CM2G 琼脂培养基, 然后接种到 1 升纯水含有 80g 葡萄糖, 1g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.4g MgSO<sub>4</sub>·30g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.01g FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.01g MnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 15ml 大豆水解物溶液, 200 $\mu$ g 盐酸硫胺素, 300 $\mu$ g 生物素和 50g CaCO<sub>3</sub> 的培养基 (用 KOH 调 pH 至 8.0) 中, 31.5 °C 培养 16 小时。用普通方法离心培养液, 收集细菌细胞。

磨碎细菌细胞得到粗提取物, 用来利用分子微生物学, 6 (3), 317 - 326 (1992) 中描述的方法测量 ATCC13869/pGDH, ATCC13869/GDH + GLTA + ICD 和 ATCC13869/ pGDH + GLTA + ppc 的 GDH 活性。结果发现这些转化体的每一种与 ATCC13869/ pSAC4 对照相比有 13 倍的 GDH 活性 (表 4)。用微生物学, 140, 1817 - 1828 (1994) 的方法测量 ATCC 13869/pGLTA, ATCC13869/ GDH + GLTA + ICD, 和 ATCC13869/ pGDH + GLTA + ppc 的 CS 活性。用 J. Bacteriol., 177, 774 - 782 (1995) 的方法测量 ATCC13869/pICD 和 ATCC13869/ GDH + GLTA + ICD 的 ICDH 活性。用基因, 77, 237 - 251 (1989) 的方法测量 ATCC13869/ pPPC 和 ATCC13869/ pGDH + GLTA + ppc 的 PEPC 活性。测量结果由表 5 - 7 给出。发现任何转化体与 ATCC13869/ pSAC4 对照相比均有 2 到 20 倍的目的酶活性。该事实证明 pGDH, pGLTA, pPPC, pICD, pGDH+GLTA+ICD 和 pGDH+GLTA+PPC 的各基因在乳酸发酵短杆菌中表达并执行功能。

表 4

<u>细菌菌株</u>	<u>GDH 活性</u> ( $\Delta$ Abs/min/mg 蛋白)
ATCC 13869 / pGDH	1.36
ATCC13869 / pGDH+GLTA+ICD	1.28
ATCC13869 / pGDH+GLTA+PPC	1.33
ATCC13869 / pSAC4	0.11



表 5

<u>细菌菌株</u>	<u>CS 活性</u> ( $\mu\text{mole/min/mg}$ 蛋白)
ATCC 13869 / pGLTA	5.5
ATCC13869 / pGDH+GLTA+ICD	4.8
ATCC13869 / pGDH+GLTA+PPC	4.8
ATCC13869 / pSAC4	0.7

表 6

<u>细菌菌株</u>	<u>PEPC 活性</u> (units/min/mg 蛋白)
ATCC 13869 / pPPC	1.12
ATCC13869 / pGDH+GLTA+PPC	1.04
ATCC13869 / pSAC4	0.11

5

表 7

<u>细菌菌株</u>	<u>ICDH 活性</u> (units/min/mg 蛋白)
ATCC 13869 / pICD	3.5
ATCC13869 / pGDH+GLTA+ICD	2.8
ATCC13869 / pSAC4	1.0

实施例 8:  $\Delta$ S 菌株的 L 谷氨酸生产, 以及具有扩增的 *gdh*,  
*gltA*, *ppc* 和 *icd* 基因的  $\Delta$ S 菌株

(1) 发酵罐中  $\Delta$ S 菌株 L - 谷氨酸生产的评价

- 10 在 1 升纯水中含有 60g 葡萄糖, 1g  $\text{KH}_2\text{SO}_4$ , 0.4  $\text{MgSO}_4$ , 30g  
 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.01g  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.01g  $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 15ml 大豆水解  
 物溶液, 200 $\mu\text{g}$  盐酸硫胺素和 450 $\mu\text{g}$  生物素的培养基 (300ml) 加入 1  
 升容积的发酵罐, 加热灭菌。在 CM2G 琼脂培养基上培养得到的  $\Delta$ S 菌  
 株的细菌细胞接种于其中, 31.5  $^\circ\text{C}$  培养 30 小时, 用氨气调整 pH 至 7.0,  
 15 7.2 或 7.5。

培养完毕, 测量培养基中细菌细胞浓度和积累的 L - 谷氨酸的量。

用旭化成公司制造的 Biotech Analyzer AS-210 定量确定 L - 谷氨酸。将培养液用纯水稀释至 51 倍，用 660 nm 处吸收 ( OD<sub>660</sub> ) 测量细菌细胞浓度。结果由表 8 给出。

5

表 8

pH	细菌细胞浓度 ( OD )	L - 谷氨酸 ( g / l )
7.0	0.84	35
7.2	0.85	34
7.5	1.07	32

已确证尽管  $\Delta S$  菌株培养于含过量生物素的培养基中，仍能高产率地生产并积累 L - 谷氨酸。

10 ( 2 ) 发酵罐培养的  $\Delta S$  菌株以及带有扩增的 *gdh*, *gltA*, *ppc* 和 *icd* 基因的  $\Delta S$  菌株 L - 谷氨酸生产的评价

将上述制备的 pGDH, pGLTA, pPPC, pICD, pGDH+GLTA+ICD 或 pGDH+GLTA+PPC 导入  $\Delta S$  菌株以评价导入各质粒的转化体的 L - 谷氨酸生产能力，用电脉冲法 ( 日本公开专利 2 - 207791 号 ) 将质粒导入乳酸发酵短杆菌的细胞中。用 1 升纯水中含有 10g 多聚蛋白胨，10g 酵母提取物，5g 葡萄糖，5g NaCl 和 15g 琼脂及含有 4 $\mu$ g /ml 氯霉素的 CM2G 平板培养基 ( pH7.2 ) 选择得到的转化体。

如上述 ( 1 ) 款那样评价  $\Delta S$  菌株及得到的转化体的 L - 谷氨酸生产能力。

20 用与上述相同的方法测量培养后培养基中细菌细胞浓度和积累的 L - 谷氨酸的量。结果由表 9 给出。

25

表 9

菌株	细胞浓度 ( OD )	L - 谷氨酸 ( g / l )
$\Delta S$	0.84	35
$\Delta S / pGDH$	1.01	35
$\Delta S / pGLTA$	0.83	37
$\Delta S / pICD$	0.83	37
$\Delta S / pPPC$	0.75	37
$\Delta S / pGDH+GLTA+ICD$	0.95	38
$\Delta S / pGDH+GLTA+PPC$	0.85	40
$\Delta S / pSAC4$	0.83	35

实施例 9：具有扩增  $\alpha$  - KGDH 基因的产 L - 赖氨酸细菌的  
L - 赖氨酸生产

- 5 上述制备的 pPKS-X 和 pPK4 分别导入乳酸发酵短杆菌 AJ 12435 (FERMBP - 2294)，该菌对 S - (2 - 氧乙基) - L - 半胱氨酸表现抗性并具有通过诱变乳酸发酵短杆菌 ATCC 13869 得到的 L - 赖氨酸生产能力。评价其 L - 赖氨酸生产能力，用电脉冲法 (日本公开专利 2 - 207791 号) 导入质粒。用在 1 升纯水中含有 10g 多聚蛋白胨，10g 酵母提取物，5g 葡萄糖，5g NaCl 和 15g 琼脂并含有 25 $\mu$ g / ml 卡那霉素的 CM2G 平板培养基 (pH7.2) 选择转化体。

- 15 如下评价 L - 赖氨酸生产能力。一种在 1 升纯水中含有 100g 葡萄糖，1g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>，0.4g MgSO<sub>4</sub>，30 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>，0.01g FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O，0.01g MnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O，15ml 大豆水解物溶液，200 $\mu$ g 盐酸硫胺素，300 $\mu$ g 生物素，25mg 卡那霉素和 50g CaCO<sub>3</sub> (用 KOH 调 pH 至 7.0) 的培养基 (各 20ml) 配好后倒入 500ml 容积的烧瓶，加热灭菌。将在含有 4mg / l 卡那霉素的 CM2G 平板培养基上培养得到的 AJ 12435/pPK4 和 AJ 12435 / pPKS-X 的细菌细胞接种于其中，37℃ 培养 20 小时，培养完毕，测量培养液中生产和积累的 L - 赖氨酸的量以及细菌细胞浓度。结果由
- 20 表 10 给出。

表 10

<u>菌株</u>	<u>L - 赖氨酸</u> <u>( g / l )</u>	<u>细胞浓度</u> <u>( OD )</u>
AJ 12435/ pPK4	26	1.15
AJ 12435/ pPKS-X	31	0.92

工业应用性

5 已表明产 L - 谷氨酸棒状杆菌的  $\alpha$  - KGDH 活性水平影响 L - 谷氨酸的发酵生产。因而可能通过插入抗药相关基因等制备  $\alpha$  - KGDH 基因活性缺陷菌株, 通过体外突变制备活性渗漏菌株, 通过修饰启动子制备表达降低的菌株等有效地培育与常规产 L - 谷氨酸棒状杆菌相比 L - 谷氨酸生产能力进一步提高的细菌菌株。

10

15

20

25